基于 RNA-seq 数据的窄足真蚋 SSR 分子标记开发

郭 欢, 王 刚, 张树田, 黄 敏*

(西北农林科技大学昆虫博物馆, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】窄足真蚋 *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes* 属嗜血蚋种,并传播禽类疾病。本研究旨在通过 RNA-seq 技术获得窄足真蚋的转录组数据,进而开发其微卫星标记,为窄足真蚋的种群遗传学研究提供可靠的分子标记。【方法】以采自陕西宝鸡和新疆阿勒泰地区的窄足真蚋幼虫为材料,构建转录组数据库。使用软件 MISA (microsatellite identification tool)搜索窄足真蚋 unigenes 库中的所有 SSR 位点,并随机挑选 SSR 位点,利用软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.7 设计微卫星引物。经 PCR 扩增和电泳检测,用 Cervus 3.0.7 等生物信息学软件进行统计分析,筛选多态性微卫星引物。利用 BlastX 比对 Nr 和 Swiss-Prot 蛋白质数据库,对含多态性 SSR 位点的 unigenes 进行功能注释。【结果】共鉴定出 29 471 个 SSRs。最丰富的重复基序是单核苷酸重复类型,占总 SSR 数的 87.05%;其次是三核苷酸重复类型,占 7.95%。共发现 34 种碱基重复基序,主要是 A/T 基序重复,占 86.93%。15 对微卫星引物均成功扩增出特异性产物,含 12 对具多态性的微卫星分子标记。比对结果显示,7 个 SSR 位点来自注释基因序列。【结论】基于 RNA-seq 二代测序技术可实现窄足真蚋 SSR 分子标记的高效率开发,对窄足真蚋的种群遗传学研究具有重要意义。

关键词: 窄足真蚋; RNA-seq 数据; 微卫星 DNA; SSR 分子标记; 多态性

中图分类号: Q969　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)07-0815-10

Development of SSR primers for *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes* (Diptera: Simuliidae) based on RNA-seq dataset

GUO Huan, WANG Gang, ZHANG Shu-Tian, HUANG Min* (Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Entomological Museum, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】*Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes* is a bloodthirsty species that transmits poultry diseases. In this study, *S.* (*E.*) *angustipes* transcriptomes were sequenced using RNA-seq technology, and the SSRs were developed using transcriptome datasets, which may serve as reliable molecular markers for population genetics research of simuliids.【Methods】Transcriptome database of *S.* (*E.*) *angustipes* larvae collected from Baoji of Shaanxi and Altay of Xinjiang was constructed. The software MISA was used to explore all the microsatellite loci in the unigene database of *S.* (*E.*) *angustipes*. Primers were designed using software Primer Premier 5.0 and Oligo 6.7 from the SSR loci chosen randomly. After PCR procedure and electrophoresis detection, the primers with polymorphism for SSR were screened and analyzed using Cervus 3.0.7 and other bioinformatics softwares. Unigenes with polymorphic SSR loci were annotated using BlastX against Nr and Swiss-Prot databases.【Results】A total of 29 471 SSRs were identified in *S.* (*E.*) *angustipes* transcriptome. The most frequent repeat motifs were mononucleotide motifs (87.05%), followed by trinucleotide motifs (7.95%). Among all the 34 SSR motifs, (A/T)n

基金项目: 新疆建设兵团博士点基金(2013BB017); 科技部惠民计划(2013GS650305); 新疆生产建设兵团科学技术局(2012BAH12B03)

作者简介: 郭欢, 女, 1993 年 10 月生, 山西汾阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫系统学与生物多样性, E-mail: guohuan620@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huangmin@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-11-28; 接受日期 Accepted: 2018-04-16

was the most abundant mononucleotide motif (86.93%). SSR primers were synthesized, and 15 primers were amplified successfully, of which 12 loci were polymorphic. BlastX results indicated that seven SSR loci were identified from the annotated genes. 【Conclusion】 Based on RNA-seq sequencing technology, we can better realize the development of SSRs for *S.* (*E.*) *angustipes*, which is of great significance to the study of population genetics of this group.

Key words: *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*; RNA-seq dataset; microsatellite DNA; SSR molecular marker; polymorphism

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)又被称作微卫星 DNA 或短串连重复,核心序列长度在 1~6 bp 之间。目前,这类分子标记在昆虫分子生态学(孙荆涛等, 2012)、种群遗传学(Dumas *et al*., 1998; Meng *et al*., 2008; Peccoud *et al*., 2009; Sun *et al*., 2012; 邢丹, 2013)、入侵遗传学(Zepeda-Paulo *et al*., 2010; 吴仲真等, 2011; Yang *et al*., 2012; 曹利军, 2016)以及物种形成过程及分类地位的研究(Kent, 2009; Conflitti *et al*., 2014)方面均有大量应用,极大地促进了上述领域的研究。

但是,微卫星标记制备方法和过程繁杂(常玉梅等, 2005),制约了其广泛应用。新一代高通量测序技术的成熟及测序成本的降低为微卫星标记开发提供了很大便利。如通过全基因组、表达序列标签(expressed sequence tag, EST)和转录组(transcriptome)3 种数据库进行 SSR 位点定位和筛选,联合 Primer Premier 等软件设计出能扩增出目的产物的特异性引物(王娟娟等, 2016)。尤其在非模式生物的微卫星标记开发方面,现阶段可充分利用 EST 数据库和转录组数据,大大提高开发效率,使其广泛应用于各类昆虫的研究当中(Hahn *et al*., 2009; 李傲祥, 2010; 刘玉娣和侯茂林, 2010; 魏丹丹等, 2014; 蒋欣雨, 2014; Duan *et al*., 2017; Tang *et al*., 2017; 李微等, 2017; 熊翠玲等, 2017)。

窄足真蚋 *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes* 隶属于双翅目(Diptera)蚋科(Simuliidae)蚋属 *Simulium* 真蚋亚属 *Eusimulium*。其幼虫生活于流速较慢、较温暖的河流,通常容易在平坦的河流被采集到(Ciadamidaro *et al*., 2016),也可在较小的河流被发现(Klink, 2010)。窄足真蚋属于嗜血种类,常攻击鸟类,且是原生动物寄生虫住白细胞虫(Leucocytozoon)和鸟类锥虫病[Trypanosoma (bird trypanosomiasis)]的传播媒介(Day *et al*., 2010)。其在中欧的猛禽中寄生率极高,Ivković等(2014)连续两年在普利特维采湖的采集结果显示,窄足真蚋的寄生率分别达到 99.00% 和 97.48%。其空间取食偏好冠层,与其在鸟类锥虫传播中的作用一致(Černý *et al*., 2011)。此外,窄足真蚋还可携带螺旋体,其中一些螺旋体种类对人类和动物有致病性(Šikutová *et al*., 2010)。目前,国内关于窄足真蚋的报道仅限于名录,国外对窄足真蚋的研究多集中于其区系调查(Lewis, 1966; Crosskey *et al*., 1996; Kalafat and Şirin, 2011)、生态习性和流行病学研究(Reidelbach and Christl, 2002; Kozlov *et al*., 2005; Klink, 2010; Lock *et al*., 2014; Ciadamidaro *et al*., 2016),但关于窄足真蚋微卫星引物设计的研究很少,且蚋科昆虫整体缺乏基因组信息,若采用传统方式进行 SSR 标记的开发,可能会限制 SSR 标记技术在其种群遗传学研究中的应用。因此,本研究基于 RNA-seq 数据辅以 MISA (MIcroSAtellite identification tool, http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/)等计算机软件对窄足真蚋幼虫的微卫星位点进行挖掘,并对其组成、分布及特征展开了分析,以期为开发新的 SSR 标记提供依据,为深入研究其种群遗传学和生物学特性提供理想的分子标记。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及鉴定

本实验用于验证引物的窄足真蚋幼虫采自陕西省宝鸡市和新疆阿勒泰地区。参照《中国蚋科昆虫》(陈汉彬, 2016)对幼虫样本进行形态鉴定,然后放入无酶 EP 管中编号,暂时于液氮中保存。在超净工作台上将无酶 EP 管中的幼虫用无菌镊子取出,取灼烧后冷却的刀片将幼虫体躯分为两部分,一部分仍保存于无酶 EP 管中(置于 -80℃ 冰箱保存),另一部分保存于普通 EP 管中(编号与无酶 EP 管号码相对应)进行全基因组 DNA 提取。试虫基因组 DNA 提取采用试剂盒法(BSC26S1, Biospin 公司)。

采用 *COI* 分子标记对试虫进一步确认。*COI* 基因片段引物依照 Folmer 等(1994);PCR 反应体系为

25 μL：窄足真蚋幼虫总 DNA 模板 2 μL，2 × Taq MasterMix 12.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，无菌水补至 25 μL。PCR 反应程序：94℃ 预变性 1 min；94℃变性 1 min，55℃退火 1 min，72℃ 延伸 1.5 min，共 35 个循环；72℃延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。选择条带清晰的对应 PCR 产物送由上海生工生物工程有限公司进行测序，于 NCBI 数据库进行序列比对。比对结果显示试虫为窄足真蚋 *Simulium*（*Eusimulium*）*angustipes*。

1.2　主要实验试剂

实验所涉及引物均由上海生工生物工程有限公司合成；2 × Taq MasterMix 购自于 ComWin Biotech 公司；DL2000 DNA Marker，DL500 DNA Marker 和 20 bp DNA Ladder 等购自于 TaKaRa 公司。

1.3　RNA-seq 建库测序和组装

陕西和新疆窄足真蚋幼虫的转录组测序委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行，测序平台为 Illumina HiSeq 4000。首先对 RNA 样品进行检测，检测内容主要包括 RNA 降解程度以及是否有污染、RNA 的纯度检测（OD_{260}/OD_{280} 值）、RNA 浓度定量以及 RNA 的完整性检测。样品检测合格后，用带有 Oligo（dT）的磁珠富集真核生物 mRNA。随后以 mRNA 为模板，合成并纯化双链 cDNA，对纯化的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头后进行片段大小选择。经过 PCR 扩增及 PCR 产物纯化，得到最终的文库。库检合格后即可上机测序。

对测序得到的原始数据（raw reads）进行过滤，剔除带接头（adapter）、N（N 表示无法确定碱基信息）比例大于 10% 和低质量的 reads 后，得到去杂读长（clean reads）。对于无参考基因组的窄足真蚋，需要进行 *de novo* 测序（缺省值 k-mer = 25），即经由 *de novo* 组装软件 Trinity 将 clean reads 拼接为重叠群 contigs，对 contigs 进行 Corset 层次聚类和去冗余处理，取最长的一条转录本作为 gene，以获取该蚋种的 unigene 库用于后续分析。

1.4　SSR 分子标记开发

1.4.1　SSR 位点鉴定和引物设计：采用软件 MISA（1.0 版，默认参数）对 unigenes 进行 SSR 位点检测，搜索参数设置为：以单核苷酸为重复单位时，其重复数至少为 10 才可被检测到；以双核甘酸为重复单位时，其最少重复数为 6；3 – 6 核苷酸至少重复 5 次。两个 SSR 位点碱基间隔小于或等于 100 bp。

根据软件 MISA 的输出结果，采用软件 Primer Premier 5.0 结合 Oligo 6.7 设计引物，引物的设计基于以下标准：（1）GC 含量约为 40% ~ 60% 之间；（2）T_m 值在 57 ~ 62℃之间；（3）上下游引物 GC 含量和 T_m 值保持接近；（4）引物序列长度在 18 ~ 24 bp；（5）预期的 PCR 产物大小为 100 ~ 290 bp；（6）3′端 Deta-G 值绝对值不超过 9；（7）Deta-G 值 5′端和中间高，以利于序列与模板结合；（8）T_m 值曲线以选取 72℃附近为佳，5′ – 3′呈下降形状，使有利于引发聚合反应。

1.4.2　SSR 引物扩增：PCR 反应体系为 25 μL：2 × Taq MasterMix 12 μL，无菌水 9 μL，窄足真蚋幼虫总 DNA 模板 2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL。反应程序：94℃ 预变性 2 min，94℃ 变性 30 s，58℃ 退火 16 s，72℃ 延伸 30 s，共 36 个循环；72℃ 延伸 4 min。

1.4.3　SSR 引物的多态性分析及功能注释：使用 2% 琼脂糖凝胶初步检测 SSR 引物是否具有特异性。根据引物筛选结果，随机选取陕西窄足真蚋幼虫群体 25 头个体进行 SSR 标记的多态性验证，扩增产物用高灵敏度的 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行片段分离。PCR 产物配以 6 × loading buffer，保证电泳初始所有样品处于相同水平位置。吸取 0.5 ~ 1 μL 混合物至点样孔中，并以 20 bp DNA Ladder 作为标准对照。在 500 V 恒压下电泳 2 h。0.2% $AgNO_3$ 溶液染色，显影液（250 mL 1% NaOH + 1 mL 37% 甲醛）显色，索尼数码相机拍照记录。用软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 分析电泳图，得到每个微卫星位点基因片段的长度，即可确定群体中各个体的基因型。所得数据利用软件 CONVERT 1.31 转换为 Genepop 格式，利用软件 Cervus 3.0.7 计算微卫星标记的等位基因数 *Na*、观测杂合度 *Ho*、期望杂合度 *He*、多态信息含量 *PIC* 和无效等位基因频率，用 Genepop 4.5.1 判断各位点的 Hardy-Weinberg 平衡偏离情况；将含有多态性 SSR 的 unigenes 与 Nr 和 Swiss-Prot 蛋白质数据库进行 BlastX 比对注释（E 值为 1e – 5）。

2　结果

2.1　RNA-seq 测序及组装结果

对窄足真蚋幼虫转录组测序共获得 103 035 130 个 raw reads，过滤后得到 99 370 228 个 clean reads，碱基错误率为 0.02%，Q20（碱基正确识别率为 99%）达 95.49%，Q30（碱基正确识别率为 99.9%）达 89.27%，GC 含量为 43.91%，说明基于 RNA-seq

技术的测序数据质量良好。组装后共获得窄足真蚋幼虫单基因簇(unigenes) 43 129 个,平均长度为 1 555 bp (表1),N50 值为2 492 bp。对于转录组测序而言,一般其组装序列的 N50 值大于 500 才可用于后续分析,本研究的测序结果表明窄足真蚋 unigenes 组装效果良好,获得了较高准确度的转录组序列。本研究所测得的转录组数据已上传至 NCBI 的 SRA 数据库,登录号:SRP133998(未公开)。

表1 窄足真蚋幼虫转录组单基因簇的长度统计

Table 1 Length statistics of unigenes in the transcriptome sequences of the larva of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

最小长度(bp) Minimum length	平均长度(bp) Mean length	中位长度(bp) Median length	最大长度(bp) Maximum length	N50 值(bp) N50	N90 值(bp) N90	总核苷酸数 Total nucleotides
201	1 555	998	23 652	2 492	675	67 047 055

2.2 窄足真蚋幼虫转录组 SSR 序列分析

使用软件 MISA 搜索转录组数据中潜在的 SSR 基因位点。在43 129 个 unigenes 中共鉴定出29 471 个 SSR,重复单元类型共计 34 种,存在于 15 549 个 unigenes 中,发生频率为36.05%(SSR 所在 unigenes 数目与总 unigenes 数目之比)。在所有含 SSR 序列中,6 684 个 unigenes 含有多个 SSR,复合型 SSR 共计2 819 个(表2)。在29 471 个 SSR 中,最丰富的重复基序类型是单核苷酸重复类型(25 655 个,占 87.05%),其次为三核苷酸重复类型(2 344 个,占 7.95%),然后是二核苷酸(1 373 个,占4.66%)和四核苷酸(88 个,占 0.30%)的重复类型。五核苷酸(4 个,占0.01%)和六核苷酸(7 个,占0.02%)重复类型所占比例很小。具有不同模序重复次数 SSR 的出现频率见表3,窄足真蚋幼虫转录组 SSR 重复单元的重复次数为5~23 次,极个别基序重复次数可达到29 次(AGC/CTG)和35 次(AG/CT),甚至50 次(ACT/AGT);从表3 可以得出单核苷酸重复次数大多为 10~14 次,二核苷酸重复次数多为 6~9 次,三核苷酸重复次数多为5~8 次,四核苷酸重复次数为5~6 次,五核苷酸和六核苷酸重复次数分布比较均匀,可能是由于两者含量少的原因。其中,具有10 个串联重复单位的 SSR 最常见(15 270 个,占51.81%),其次是 11 个串联重复(4 643 个,占15.75%),12 个串联重复(1 890 个,占6.41%)和5 个串联重复(1 733 个,占5.88%)。

表2 窄足真蚋幼虫转录组数据 SSR 分析的基本统计

Table 2 Summary of the SSRs identified in the transcriptome sequences of the larva of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

SSR 信息 SSR information	数量 Number
用于标记开发的 unigenes 总数 Total number of unigenes examined	43 129
被检测 unigenes 总长度 Total size of examined unigenes (bp)	67 047 055
识别的 SSR 总数 Total number of identified SSRs	29 471
含 SSR 的 unigenes 总数 Number of SSR-containing unigenes	15 549
包含1 个以上 SSR 的 unigenes 数 Number of unigenes containing more than one SSR	6 684
复合型 SSR 总数 Number of SSRs present in compound form	2 819

表3 基于重复单元数目的 SSRs 在窄足真蚋幼虫转录组中的出现频率

Table 3 Frequency of SSRs based on the number of repeat units in larval transcriptome of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

重复类型 Repeat type	重复数 Number of repeats											合计 Total	百分比 Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15		
单核苷酸 Mononucleotide	0	0	0	0	0	15 244	4 603	1 882	833	533	2 560	25 655	87.05
二核苷酸 Dinucleotide	0	809	293	135	60	26	40	8	0	1	1	1 373	4.66
三核苷酸 Triucleotide	1 656	464	187	29	0	0	0	0	0	0	8	2 344	7.95
四核苷酸 Tetranucleotide	75	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	0.30
五核苷酸 Pentanucleotide	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	4	0.01
六核苷酸 Hexaucleotide	1	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1	7	0.02
总计 Total	1 733	1 287	481	165	62	15 270	4 643	1 890	833	536	2 571	29 471	–
百分比 Percentage	5.88	4.37	1.63	0.56	0.21	51.81	15.75	6.41	2.83	1.82	8.72	–	–

对 SSR 基元的出现频率进行统计(图 1)，结果显示最常见的 SSR 基序是 A/T，高达 86.93%，其次是 AAC/GTT(4.43%)，AC/GT(3.52%)和 AAT/ATT(1.35%)。单核苷酸重复中，A/T 基序所占比例最大(86.93%)；二核苷酸重复中主要是 AC/GT 基序(占 3.52%)，其次是 AG/CT 基序(占 0.53%)；三核苷酸重复中 AAC/GTT 基序最多(占 4.43%)，CCG/CGG 基序最少(占 0.12%)(图 1)。其他基元出现频率百分比超过 0.2% 的有 AGC/CTG，ACC/GGT，AAG/CTT 和 ACG/CGT。基序出现频率百分比超过 0.1% 的有 C/G，ACT/AGT，CCG/CGG，AGG/CCT 和 AAAT/ATTT。

2.3　SSR 引物筛选以及多态性检测

利用软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.7 对随机挑选的含 SSR 位点的 unigenes 进行引物设计，初步筛选出 15 对能扩增出特异性条带的引物，利用陕西群体进行多态性检测，多态性位点($Na \geq 2$)SA-3 的扩增产物电泳结果见图 2。试验共获得 12 个具有多态性的 SSR 位点，多态性引物(表 4)比例达到 80%，表明依靠 RNA-seq 转录组数据开发 SSR 引物的方法可行。

12 个多态性引物在窄足真蚋陕西群体 25 头幼虫个体中进行了扩增，共获得 64 个等位基因，等位基因数范围为 2～11 个，平均每位点产生 5.33 个等位基因，其中位点 SA-1 等位基因数最多(11 个)。窄足真蚋陕西群体的各遗传多样性参数见表 5，观测杂合度 *Ho*、期望杂合度 *He* 和多态信息含量 *PIC* 分别为 0.000～0.840，0.344～0.898 和 0.291～0.868。位点 SA-1，SA-5，SA-6，SA-9，SA-11 和 SA-12 的杂合度较高，适用于群体遗传多样性分析；各个位点的 *PIC* 波动范围为 0.291～0.868，其中 7 个位点是高度多态位点($PIC > 0.5$)，其余 5 个位点为中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$)，可为后续窄足真蚋遗传多样性研究提供可靠的遗传信息。利用软件 Genepop 对各位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验，位点 SA-4，SA-7，SA-8 和 SA-10 极显著偏离哈温平衡，观察发现上述 4 个位点的观测杂合度 *Ho* 显著低于期望杂合度 *He*，说明出现偏离哈温平衡的现象可能是由于这些位点杂合子不足。

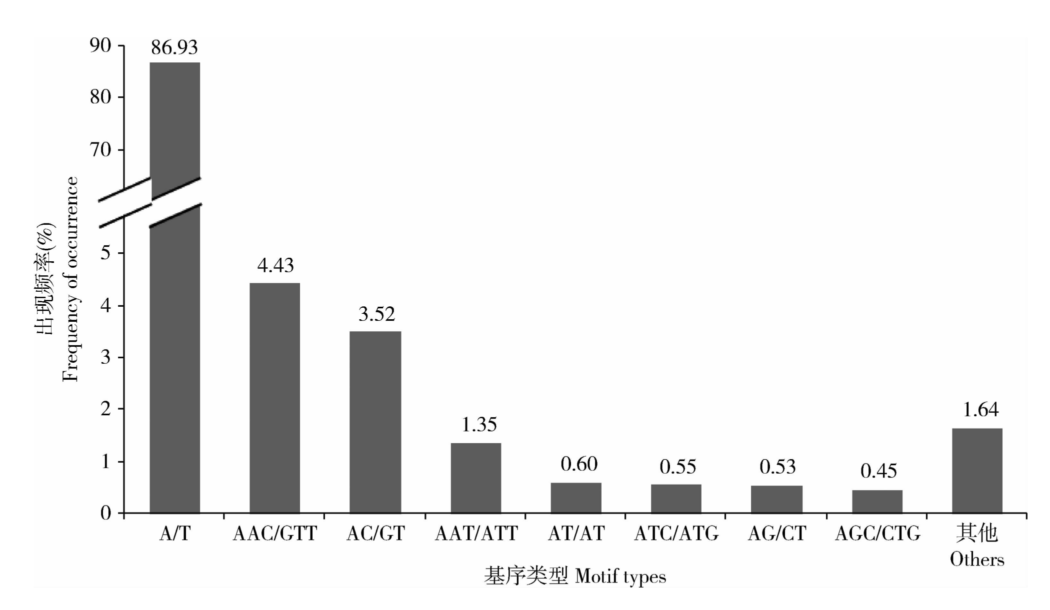


图 1　SSRs 基序在窄足真蚋幼虫转录组中的出现频率

Fig. 1　Frequency of SSR motifs in larval transcriptome of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

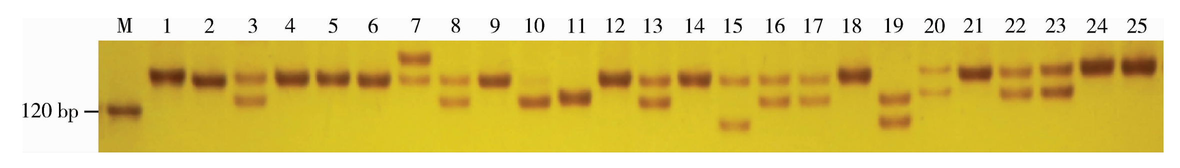


图 2　SA-3 位点在窄足真蚋陕西种群幼虫个体中的多态性分析

Fig. 2　Polymorphic analysis of loci SA-3 in larvae of Shaanxi population of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1－25：不同幼虫个体 Different larval individuals.

表 4 SSR 引物序列及相关信息

Table 4 Sequences and related information for SSR primers

位点 Loci	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物大小(bp) Product size	基序和重复数 Motif and number of repeats	退火温度(℃) Annealing temperature	功能注释*/E 值 Functional annotations/E value
SA-1	F：TAACGCAACACTGGTCGACA R：AACACTGGCCGACAAAAGG	183	$(GT)_9$	58	AAEL000624-PA [埃及伊蚊 *Aedes aegypti*]/2.4E-147
SA-2	F：TGCGGATGGATGAAGCTGAA R：CTTGTTGCCGGCTTTAGCTG	100	$(CA)_8$	58	无 Null
SA-3	F：TGACGGAGGAATCAAAGCGT R：TGTGCCATTCAAAGTGTGCG	124	$(CAA)_6$	58	AAEL009460-PA [埃及伊蚊 *Aedes aegypti*]/1.8E-127
SA-4	F：CACCGTCCGAACTCAACCT R：TGAATCTCCTCCGTCACCA	250	$(GAA)_6$	58	AAEL006013-PA [埃及伊蚊 *Aedes aegypti*]/7.7E-162
SA-5	F：CCGTTTGACTGACACAGGGA R：CATCCTGTCTTGGCAGTGGA	166	$(AC)_6$	62	无 Null
SA-6	F：GTCTCCGCGATACTTGAGCA R：AGTCACCCTGTCACAGCTTG	248	$(TG)_8$	58	无 Null
SA-7	F：TAGTCGGCGACAACGAGATC R：CCTGGACCTTTGGGATAACA	205	$(GT)_6$	58	无 Null
SA-8	F：AACGCACACAGACACAAACTTC R：ACTACTGATTGCTGGCAAATGA	178	$(GCG)_5$	58	GATAa2 转录因子 GATAa2 transcription factor [达氏按蚊 *Anopheles darlingi*]/5.9E-73
SA-9	F：AGTGCGGGTATTTTCTTGTCCT R：AGCTCCGCACTTCATACCAC	217	$(GTTT)_5$	62	无 Null
SA-10	F：CACGTCAATGTACCGTCATGC R：AGGCTTAGTGAACATAGCTACTCG	191	$(AAT)_7$	62	假想蛋白 Hypothetical protein DVIR88_6g0061 [黑果蝇 *Drosophila virilis*]/8.3E-55
SA-11	F：CCTCCATAAACGCGCGAGTA R：TCGTCGATAGTCGCGTTTGT	191	$(ATG)_8$	60	预测：跨膜蛋白 164 Predicted: transmembrane protein 164 [芜菁叶蜂 *Athalia rosae*]/5.3E-82
SA-12	F：TTATCATAGTGTTGACGGAGGA R：CTTCGCATTTGTGCCATT	149	$(CAA)_6$	58	假想蛋白 Hypothetical protein ZHAS_00020363 [中华按蚊 *Anopheles sinensis*]/1.6E-83

* 利用 Nr 和 Swiss-Prot 蛋白质数据库对含有多态性 SSR 的 unigenes 进行了功能注释(E 值 = 1e-5)。The SSR-containing unigenes were annotated using BlastX against Nr and Swiss-Prot databases with an E-value cutoff of 1e-5.

表 5 窄足真蚋陕西种群中 12 个微卫星位点遗传多样性

Table 5 Genetic diversity parameters of 12 SSR markers across Shaanxi population of *Simulium* (*Eusimulium*) *angustipes*

位点 Loci	等位基因数 *Na*	观测杂合度 *Ho*	期望杂合度 *He*	多态信息含量 *PIC*	哈温平衡 P_{HWE}
SA-1	11	0.720	0.898	0.868	0.0136*
SA-2	3	0.400	0.344	0.307	1.0000
SA-3	4	0.440	0.478	0.403	0.3964
SA-4	9	0.360	0.798	0.757	0.0000**
SA-5	7	0.840	0.857	0.819	0.1202
SA-6	6	0.640	0.730	0.671	0.2702
SA-7	3	0.200	0.482	0.393	0.0003**
SA-8	2	0.125	0.361	0.291	0.0044**
SA-9	4	0.520	0.545	0.487	0.3705
SA-10	4	0.000	0.744	0.681	0.0000**
SA-11	7	0.708	0.738	0.681	0.5706
SA-12	4	0.520	0.611	0.525	0.0955

* SSR 位点显著偏离哈温平衡 SSR loci significantly deviated from the Hardy-Weiberg equilibrium (HWE) ($P<0.05$); ** SSR 位点极显著偏离哈温平衡 SSR loci extremely significantly deviated from HWE ($P<0.01$).

2.4　窄足真蚋多态性 SSR 标记的功能注释

通过对含有多态性 SSR 的窄足真蚋基因序列与 NCBI 上的 Nr 库和 Swiss-Prot 蛋白质数据库进行比对注释（E 值为 le－5），获取与近缘物种基因序列的相似性以及本物种基因的功能信息，结果有 7 个 SSR 位点来自注释基因序列，其中 3 个位点可注释到埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 相关蛋白，其余位点分别与达氏按蚊 *Anopheles darlingi*、中华按蚊 *Anopheles sinensis*、黑果蝇 *Drosophila virilis* 和芜菁叶蜂 *Athalia rosae* 的已知功能基因相关（表 4）。这些 SSR 位点可能扮演调控基因表达的角色，将对相应基因的准确筛选和分析有很大意义。

3　结论与讨论

在本研究中，首次应用高通量 Illumina 测序技术对无参物种窄足真蚋进行测序，共获得了 43 129 个 unigenes，利用生物信息学方法从窄足真蚋转录组数据中预测出 29 471 种潜在的 SSR 标记，分布于 15 549 个 unigenes 中，发生频率为 36.05%，高于其他许多昆虫的 SSR 发生频率，如东方粘虫 *Mythimna separata*（9.848%）（李微等，2017）、柑桔粉虱 *Dialeurodes citri*（0.41%）（陈二虎，2014）、烟粉虱 *Bemisia tabaci*（5.07%）（Xie *et al*.，2012）、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*（5.79%）（罗梅等，2014）、沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica*（4.53%）（张鹏飞等，2016）和沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus*（35.14%）（崔明明等，2017）等。由此推测高 SSR 发生频率是窄足真蚋幼虫的特征之一，同时验证了基于 RNA-seq 二代测序技术可实现 SSR 分子标记的高效率开发，可为其他蚋科昆虫的 SSR 分子标记挖掘提供借鉴。

窄足真蚋幼虫 SSR 位点种类丰富，共计 34 种。其中单核苷酸重复的类型数目最多，出现频率高达 87.05%，重复类型共计 2 种，分别为 A/T（86.92%）和 C/G（0.13%）；其次为三核苷酸重复类型，所占比例为 7.95%，重复次数主要集中在 5～8 次，优势重复基元类型为 AAC/GTT，AAT/ATT 和 ATC/ATG；二核苷酸重复类型所占比例为 4.66%，以 6～9 次重复为主，其中 CG/CG 基序仅有 6 个，验证了前人研究结果，即在动植物基因组或转录组中，CG/CG 是 SSR 重复类型中的稀有重复基元（张鹏飞等，2016）；四、五、六核苷酸重复类型所占比例很小。其他昆虫如小菜蛾 *Plutella xylostella*（柯富士，2013）、粘虫 *Mythimna separata*（胡艳华等，2015）、扶桑绵粉蚧 *P. solenopsis*（罗梅等，2014）、沙葱萤叶甲 *G. daurica*（张鹏飞等，2016）、黄粉虫 *Tenebrio molitor*（朱家颖等，2013）等的相关研究与本研究结果相似，均显示单核苷酸重复是优势重复类型，其次为三核苷酸重复；在不考虑单碱基重复的情况下，柑橘全爪螨 *Panonychus citri*（魏丹丹等，2016）、柑桔粉虱 *D. citri*（陈二虎，2014）、桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（魏丹丹等，2014）、叶蝉（Cicadellidae）（胡德辉等，2013）和中华按蚊 *A. sinensis*（樊勇和马雅军，2008）等均以三核苷酸重复作为优势核心重复类型，这是因为三核苷酸基序是昆虫 EST-SSR 中的核心重复类型，在编码区域，三核苷酸核心基序较其他重复基元类型更加稳定，极少产生编码框滑动突变现象（Wang *et al*.，2012）。

在双翅目昆虫，如淡色库蚊 *Culexpipiens pallens*（宋锋林等，2004）、雷氏按蚊 *Anopheles lesteri*（马雅军等，2008）、致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus*（Fonseca *et al*.，1998）、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Zheng *et al*.，1996）以及桔小实蝇 *B. dorsalis*（魏丹丹等，2014）中，最常见的二核苷酸重复类型是（AC/GT）n，与其他目昆虫重复类型不同［沟眶象 *Eucryptorrhynchus chinensis*：AT/AT（武政梅等，2016）；叶蝉（Cicadellidae）：AG/CT（胡德辉等，2013）；中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*：AT/AT（熊翠玲等，2017）；小菜蛾 *P. xylostella*：GT/TG（柯富士，2013）］。本研究结果与双翅目昆虫以往研究结果一致，推测二核苷酸微卫星序列类型（AC/GT）n 含量丰富是双翅目昆虫的特点。

在合成的 15 对微卫星引物中，7 对引物具有高度多态性，5 对微卫星引物表现出中度多态性，这对于后续进一步探究窄足真蚋种群遗传结构、遗传多样性及其种群多样性的形成及进化机制等均具有重要意义。由于 NCBI 等数据库中蚋类昆虫相关蛋白研究进展缓慢，6 个含多态性 SSR 的单基因簇均注释到其他双翅目昆虫，推测这些 SSR 序列位于双翅目保守区域。

EST-SSR 的多态性通常低于 G-SSR，我们可以通过等位基因数、杂合度等遗传参数进行判定筛选，获得可用于遗传学研究的可靠标记；通过转录组测序可获得大规模的 SSR 序列，有的 SSR 与物种基因表达相关，有利于从更深层次揭示物种之间的进化关系。本研究所采取的聚丙烯酰胺凝胶电泳/银染技术虽灵敏度高，能分辨出 1 个碱基的差别，但是过

程繁杂,费时劳力,对于大样本量的检测有一定的难度。目前,可对筛选的引物进行荧光修饰,其 PCR 产物经毛细管电泳检测后,数据可同步输入到计算机,实现高通量检测样本,快速完成基因分型,可极大地促进微卫星标记的应用。

致谢 西北农林科技大学植物保护学院刘德广教授及数位匿名评审专家对本论文提出了宝贵的修改意见,在此谨表谢忱!

参考文献(References)

Cao LJ, 2016. Invasion Genetics of Fall Webworm (*Hyphantria cunea*) in China Based on Microsatellite Markers. PhD Dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. [曹利军, 2016. 基于微卫星标记的美国白蛾中国种群入侵遗传学研究. 北京: 北京林业大学博士学位论文]

Černý O, Votypka J, Svobodovú M, 2011. Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. *Med. Veter. Entomol.*, 25(1): 104–108.

Chang YM, Li SW, Liang LQ, Sun XW, 2005. Strategies for microsatellites isolation. *China Biotech.*, (S1): 210–214. [常玉梅, 李绍戊, 梁利群, 孙效文, 2005. 微卫星标记的制备策略. 中国生物工程杂志, (S1): 210–214]

Chen EH, 2014. Transcriptome Analysis and Identification of Stress-responsive Genes in Citrus Whitefly *Dialeurodes citri* (Ashmead). MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [陈二虎, 2014. 柑桔粉虱转录组分析及抗逆基因的鉴定研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Chen HB, 2016. Chinese Blackflies (Diptera: Simullidae). Guizhou Science and Technology Publishing House, Guiyang. 170–171. [陈汉彬, 2016. 中国蚋科昆虫. 贵阳: 贵州科技出版社. 170–171]

Ciadamidaro S, Mancini L, Rivosecchi L, 2016. Black flies (Diptera, Simuliidae) as ecological indicators of stream ecosystem health in an urbanizing area (Rome, Italy). *Ann. Ist. Super. Sanita*, 52(2): 269–276.

Conflitti IM, Shields GF, Murphy RW, Currie DC, 2014. The speciation continuum: population structure, gene flow, and maternal ancestry in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 78: 43–55.

Crosskey RW, Adler PH, Wang ZM, Deng CY, 1996. A taxonomic and faunal summary of the black flies of China (Diptera: Simuliidae). *J. Nat. His.*, 30(3): 407–445.

Cui MM, Tao J, Zong SX, 2017. Feature analysis of simple sequence repeats in *Eogystia hippophaecolus* transcriptome. *J. Environ. Entomol.*, 39(3): 605–610. [崔明明, 陶静, 宗世祥, 2017. 基于转录组的沙棘木蠹蛾简单重复序列特征分析. 环境昆虫学报, 39(3): 605–610]

Day JC, Mustapha M, Post RJ, 2010. The subgenus *Eusimulium* (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) in Britain. *Aquat. Insects*, 32 (4): 281–292.

Duan XL, Wang K, Su S, Tian RZ, Li YT, Chen MH, 2017. *De novo* transcriptome analysis and microsatellite marker development for population genetic study of a serious insect pest, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE*, 12(2): e0172513.

Dumas V, Herder S, Bebba A, Cadoux-Barnabé C, Bellec C, Cuny G, 1998. Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum* s. l. and their use for differentiating two savannah populations: implications for epidemiological studies. *Genome*, 41(2): 154–161.

Fan Y, Ma YJ, 2008. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite DNA markers of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *J. Fourth Milit. Med. Univ.*, (17): 1537–1539. [樊勇, 马雅军, 2008. 中华按蚊多态微卫星 DNA 位点的筛选和特征研究. 第四军医大学学报, (17): 1537–1539]

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294–299.

Fonseca DM, Atkinson CT, Fleischer RC, 1998. Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol. Ecol.*, 7(11): 1617–1619.

Hahn DA, Ragland GJ, Shoemaker DD, Denlinger DL, 2009. Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *BMC Genomics*, 10: 234.

Hu DH, Jiao XZ, Sang HY, Qiu YF, Li RB, 2013. Analysis of microsatellite information in EST resource of leafhopper. *J. South. Agric.*, 44(4): 558–561. [胡德辉, 焦晓真, 桑洪玉, 邱永福, 李容柏, 2013. 叶蝉 EST 资源的微卫星信息分析. 南方农业学报, 44(4): 558–561]

Hu YH, Li M, Zhang HF, Li SC, Wang Q, Zhao HL, 2015. The information analysis of SSR loci in the *Mythimna separate* (Walker) transcriptome. *J. Shanxi Agric. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 35(5): 484–489. [胡艳华, 李敏, 张虎芳, 李生才, 王青, 赵惠玲, 2015. 粘虫转录组中 SSR 位点的信息分析. 山西农业大学学报(自然科学版), 35(5): 484–489]

Ivković M, Kesić M, Mihaljević Z, Kúdela M, 2014. Emergence patterns and ecological associations of some haematophagous blackfly species along an oligotrophic hydrosystem. *Med. Veter. Entomol.*, 28(1): 94–102.

Jiang XY, 2014. Microsatellites Isolation and Population Genetic Structure Analysis of *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus* in China. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [蒋欣雨, 2014. 白背飞虱与灰飞虱的微卫星开发及种群遗传结构研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Kalafat A, Şirin Ü, 2011. A new record for turkish blackfly fauna: *Simulium* (*Eusimulium*) *petricolum* (Rivosecchi, 1963) (Diptera, Simuliidae). *J. Entomol. Res. Soc.*, 13(1): 49–52.

Ke FS, 2013. Characterization and Isolation of Microsatellites from the *Plutella xylostella* Transcriptome. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [柯富士, 2013. 小菜蛾转录组微卫星序列的分析和多态性位点的开发. 福州: 福建农林大学

硕士学位论文]

Kent RJ, 2009. Molecular methods for arthropod blood meal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.*, 9(1): 4-18.

Klink A, 2010. Macroinvertebrates of the Seine Basin. Hydrobiologisch Adviesburo Klink Rapporten en Mededelingen nr. 108 Project 261. 1-77.

Kozlov MV, Brodskaya NK, Haarto A, Kuusela K, Schäfer M, Zverev V, 2005. Abundance and diversity of human-biting flies (Diptera: Ceratopogonidae, Culicidae, Tabanidae, Simuliidae) around a nickel-copper smelter at Monchegorsk, northwestern Russia. *J. Vector Ecol.*, 30(2): 263-271.

Lewis D, 1966. The taxonomy of British blackflies (Diptera: Simuliidae). *Ecol. Entomol.*, 118(14): 413-506.

Li AX, 2010. Screening and Preliminary Application of EST-SSR in the Silkworm. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [李傲祥, 2010. 家蚕 EST-SSR 分子标记的筛选与初步应用. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Li W, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, Jiang XF, 2017. High-throughput discovery of microsatellite markers based on transcriptome sequencing in the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker). *J. Plant Prot.*, (3): 377-384. [李微, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 江幸福, 2017. 应用转录组测序高通量发掘东方粘虫 SSR 标记. 植物保护学报, 44(3): 377-384]

Liu YD, Hou ML, 2010. Analysis of microsatellite information in EST resource of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(3): 239-247. [刘玉娣, 侯茂林, 2010. 褐飞虱 EST 资源的微卫星信息分析. 昆虫学报, 53(3): 239-247]

Lock K, Adriaens T, Goethals P, 2014. Effect of water quality on blackflies (Diptera: Simuliidae) in Flanders (Belgium). *Limnologica*, 44(1): 58-65.

Luo M, Zhang H, Bin SY, Lin JT, 2014. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database. *Acta Entomol. Sin.*, 57(4): 395-400. [罗梅, 张鹤, 宾淑英, 林进添, 2014. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物. 昆虫学报, 57(4): 395-400]

Meng XF, Shi M, Chen XX, 2008. Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequence. *Mol. Ecol.*, 17 (12): 2880-2897.

Ma YJ, Fan Y, Wu J, 2008. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers of *Anopheles lesteri* (Diptera: Culicidae). *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 15(3): 150-153. [马雅军, 樊勇, 吴静, 2008. 雷氏按蚊多态微卫星 DNA 位点的筛选和特征. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(3): 150-153]

Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon JC, 2009. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(18): 7495-7500.

Reidelbach J, Christl H, 2002. A quantitative investigation into the temporal and spatial variations in the emergence of adult blackflies (Diptera: Simuliidae) from the Breitenbach, a small upland stream in Germany. *Limnologica*, 32(3): 206-235.

Šikutová S, Halouzka J, Mendel J, Knoz J, Rudolf I, 2010. Novel spirochetes isolated from mosquitoes and black flies in the Czech Republic. *J. Vector Ecol.*, 35(1): 50-55.

Song FL, Zhao TY, Dong YD, Cao XM, Li CX, 2004. Isolation of microsatellite DNA loci from *Culex pipiens pallens*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 11(3): 151-156. [宋锋林, 赵彤言, 董言德, 曹晓梅, 李春晓, 2004. 淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)微卫星 DNA 位点的克隆. 寄生虫与医学昆虫学报, 11(3): 151-156]

Sun JT, Lian C, Navajas M, Hong XY, 2012. Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BMC Genetics*, 13(1): 1-13.

Sun JT, Yang XM, Ge C, Hong XY, 2012. The application of microsatellite markers in insect molecular ecology. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 35(5): 103-112. [孙荆涛, 杨现明, 葛成, 洪晓月, 2012. 微卫星分子标记在昆虫分子生态学研究上的应用. 南京农业大学学报, 35(5): 103-112]

Tang PA, Wu HJ, Xue H, Ju XR, Song W, Zhang QL, Yuan ML, 2017. Characterization of transcriptome in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and gene expression analysis during developmental stages. *Gene*, 622: 29-41.

Wang B, Ekblom R, Castoe TA, Jones EP, Kozma R, Bongcam-Rudloff E, Pollock DD, Höglund J, 2012. Transcriptome sequencing of black grouse (*Tetrao tetrix*) for immune gene discovery and microsatellite development. *Open Biol.*, 2(4): 120054.

Wang JJ, Zhao M, Han YW, Wu MM, Liu RZ, Shen C, Qi ZC, 2016. Advances in development of microsatellite DNA markers and their applications in economic plant research. *Life Sci. Res.*, 20(3): 260-266. [王娟娟, 赵明, 韩雨威, 吴蒙蒙, 刘瑞振, 沈超, 祁哲晨, 2016. 微卫星 DNA 标记开发技术进展及其在经济植物研究中的应用. 生命科学研究, 20(3): 260-266]

Wei DD, Liu Y, Du Y, Li G, Li T, Yuan ML, Wang JJ, 2016. Analysis of microsatellite loci from *Panonychus citri* based on enriched microsatellite library and transcriptome dataset. *Sci. Agric. Sin.*, (2): 282-293. [魏丹丹, 刘燕, 杜洋, 李刚, 李婷, 袁明龙, 王进军, 2016. 柑橘全爪螨微卫星位点鉴定与信息分析. 中国农业科学, (2): 282-293]

Wei DD, Shi JX, Zhang XX, Chen SC, Wei D, Wang JJ, 2014. Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 25(6): 1799-1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏瑄, 陈世春, 魏冬, 王进军, 2014. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析. 应用生态学报, 25(6): 1799-1805]

Wu ZM, Gao P, Wen JB, 2016. Characteristic analysis of microsatellite in *Eucryptorrhynchus chinensis* transcriptome. *J. Environ. Entomol.*, 38(5): 979-983. [武政梅, 高朋, 温俊宝, 2016. 沟眶象转录组微卫星特征分析. 环境昆虫学报, 38(5): 979-983]

Wu ZZ, Li HM, Bin SY, Shen JM, He HL, Luo M, Ma J, Lin JT, 2011. Analysis of genetic diversity of different populations of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) using microsatellite markers. *Acta Entomol. Sin.*, 54(2): 149 - 156. [吴仲真, 李红梅, 宾淑英, 申建梅, 贺华良, 罗梅, 马骏, 林进添, 2011. 应用微卫星标记分析不同桔小实蝇种群的遗传多样性. 昆虫学报, 54(2): 149 - 156]

Xie W, Meng QS, Wu QJ, Wu QJ, Wang SL, Yang X, Yang NN, Li RM, Jiao XG, Pan HP, Liu BM, Su Q, Xu BY, Hu SN, Zhou XG, Zhang YJ, 2012. Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* transcriptome reveals a highly diverse bacterial community and a robust system for insecticide resistance. *PLoS ONE*, 7(4): e35181.

Xing D, 2013. Molecular Systematic Studies of *Culex pipiens* Complex in China. PhD Dissertation, Academy of Military Medical Sciences, Beijing. [邢丹, 2013. 中国尖音库蚊复合组分子系统学的研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文]

Xiong CL, Zhang L, Fu ZM, Wang HQ, Hou ZX, Tong XY, Li WD, Zheng YZ, Chen DF, Guo R, 2017. Large-scale development of SSR primers for *Apis cerana cerana* larvae based on its RNA-seq datasets. *J. Environ. Entomol.*, 39(1): 68 - 74. [熊翠玲, 张璐, 付中民, 王鸿权, 侯志贤, 童新宇, 李汶东, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿, 2017. 基于 RNA-seq 数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 分子标记. 环境昆虫学报, 39(1): 68 - 74]

Yang XM, Sun JT, Xue XF, Li JB, Hong XY, 2012. Invasion genetics of the western flower thrips in china: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. *PLoS ONE*, 7(4): e34567.

Zepeda-Paulo FA, Simon JC, Ramirez CC, Fuentes-Contreras E, Margaritopoulos JT, Wilson ACC, Sorenson CE, Briones LM, Azevedo R, Ohashi DV, Lacroix C, GlaisL, Figueroa CC, 2010. The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World. *Mol. Ecol.*, 19(21): 4738 - 4752.

Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Tan Y, Chang J, Gao LJ, 2016. High-throughput discovery of microsatellite markers in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from a transcriptome database. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(5): 1058 - 1064. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 谭瑶, 常静, 高利军, 2016. 基于转录组数据高通量发掘沙葱萤叶甲微卫星引物. 应用昆虫学报, 53(5): 1058 - 1064]

Zheng L, Benedict MQ, Cornel AJ, Collins FH, Kafatos FC, 1996. An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 143(2): 941 - 952.

Zhu JY, Wu GX, Yang B, 2013. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), from its transcriptome database. *Acta Entomol. Sin.*, 56(7): 724 - 728. [朱家颖, 吴国星, 杨斌, 2013. 基于转录组数据高通量发掘黄粉甲微卫星引物. 昆虫学报, 56(7): 724 - 728]

（责任编辑: 马丽萍）